

(51) Int Cl⁵ : C 07 K 7/04, 1/00; A 61 K 39/00; G 01 N 33/569

A1

(74) Mandataire : Gutmann Ernest - Plasseraud Yves S.A.

COMPOSITIONS A BASE DE PEPTIDES MULTI-
EPITOPIQUES, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LEURS
APPLICATIONS, NOTAMMENT EN TANT QUE VACCINS

L'invention a pour objet des compositions "multi-épitopes" de peptides mettant en oeuvre diverses séquences en acides aminés caractérisant un épitope fonctionnel contenant des régions hypervariables notamment issus de variants d'un agent infectieux ou d'une protéine pathogène.

L'invention vise également un procédé d'obtention de ces compositions peptidiques, ainsi que l'utilisation de ces dernières en tant que vaccins contre les pathologies susceptibles de se développer chez l'homme ou l'animal en présence des agents pathogènes du genre en question.

L'invention concerne également des méthodes de diagnostic in vitro des pathologies sus-mentionnées, mettant en oeuvre les compositions multi-épitopes selon l'invention ou des compositions d'anticorps dirigés contre l'ensemble de ces épitopes.

Le développement de vaccins fondés sur l'utilisation de protéines ou de peptides recombinants individuels bute souvent sur l'obstacle que constitue l'important degré de variabilité exercé par la pression sélective du système immunitaire sur les épitopes caractéristiques d'un agent infectieux déterminé. Un exemple typique d'épitope pouvant conduire à l'induction d'anticorps à effet protecteur variable d'un variant à l'autre d'un même groupe d'agents pathogènes est constitué

par ce que l'on a appelé l'épitope principal inducteur d'anticorps neutralisant de HIV-1 (Rusche J. R. et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 3198-3202 (1988)). Cet épitope localisé dans le troisième domaine hypervariable (V3) de la glycoprotéine majeure de surface gp120 comporte de 32 à 35 acides aminés localisés entre deux résidus cystéine liés entre eux par un pont disulfure. Ainsi a t'on observé des hétérogénéités au niveau des séquences de nucléotides codant pour des épitopes jusqu'à de l'ordre de 50 % de certains isolats rétroviraux à d'autres ; de telle sorte que des anticorps protecteurs induits par des peptides dérivés de certains isolats se sont révélés peu actifs, voire inactifs contre d'autres sous-types de HIV-1, d'où de sérieuses restrictions quant à l'efficacité de peptides issus d'un nombre restreint d'isolats en tant que principes actifs de vaccins contre des infections dues à HIV. Pour tenter de remédier à ces difficultés, Neurath, A.R. et al, J. Mol. Immunol., 27, 539-549, (1990) a proposé l'utilisation en tant que vaccin d'un mélange de peptides tous issus de la même région de la gp120, respectivement obtenus à partir de 21 isolats distincts de HIV. Le mélange obtenu s'est révélé induire un mélange d'anticorps susceptible de reconnaître à la fois les 21 peptides et la glycoprotéine 120 d'un isolat supplémentaire (HIV-1 IIIB). Mais ces mélanges risquent toujours de rester inefficaces à l'égard d'autres variants de HIV-1 non encore isolés et susceptibles de se différencier des variants connus par une ou plusieurs mutations ponctuelles supplémentaires sous

l'effet de la pression sélective du système immunitaire.

Une approche différentes du problème a conduit à l'obtention d'un peptide hybride comportant, du côté N-terminal d'un tripeptide hautement conservé Gly Pro Gly, une séquence en acides aminés isolée à partir d'un isolat (HIV-1 III B), et du côté C-terminal de ce même tripeptide une séquence en acides aminés similaire à celle sus-mentionnée et provenant d'un autre isolat (HIV-1 RF). Ce peptide hybride s'est révélé être capable d'induire la formation d'anticorps neutralisant les deux isolats (Javahrian K. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6772-6788, 1989).

Cependant, les diverses tentatives d'immunisation contre l'ensemble des différentes souches d'un même agent pathogène effectuées jusqu'à ce jour ont conduit à l'obtention de mélanges de peptides induisant que la formation d'anticorps encore trop spécifiques pour assurer avec un degré raisonnable de certitude une protection globale contre les divers variants possibles de cet agent pathogène.

L'invention a pour but de proposer des solutions plus efficaces, tant au niveau des compositions vaccinales contre des agents pathogènes caractérisés par de telles hétérogénéités de séquence que des procédés pour les produire. Elle a plus particulièrement pour but la production de mélanges de peptides en nombre beaucoup plus important capables d'induire des anticorps susceptibles de reconnaître non seulement les isolats déjà connus, mais d'autres mutants

susceptibles d'être produits ultérieurement sous l'effet de la susdite pression immunologique.

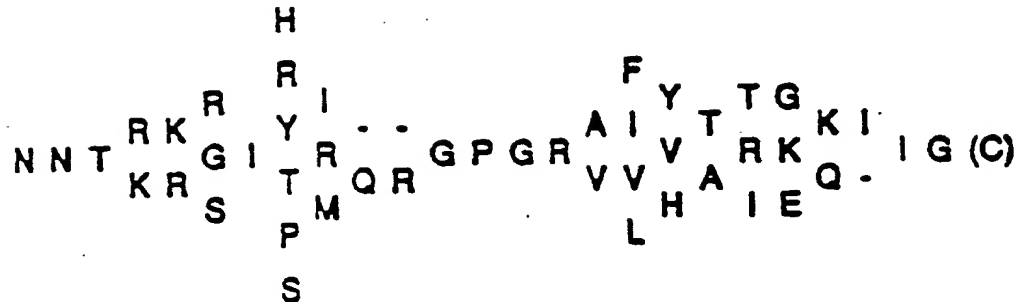
L'invention repose sur l'hypothèse que si l'on ne peut présager des degrés de simultanéité des mutations théoriquement en des positions déterminées de la séquence peptidique de l'épitope considéré, il reste néanmoins vraisemblable que, localement, en toute position déterminée au sein de la séquence d'acides aminés, les possibilités de mutations (dégénérescences) doivent néanmoins être en nombres limités. C'est ce dont semble remarquer les résultats, par exemple de Putney et al (4ème colloque des Cents Gardes, 1989-1993, (1990)) qui amplifièrent par la technique du PCR et séquencèrent la partie centrale de la région V3 de 138 isolats de HIV-1 sélectionnés selon les lois du hasard. L'hypothèse peut être faite que la plupart des mutations localement possibles (dégénérescences) ont d'ores et déjà été reconnues. D'autres mutations aux mêmes positions dans les séquences pourraient être moins probables, en raison de la moindre vraisemblance de leur compatibilité nécessaire avec le repliement spatial de la boucle que forme la région V3. Donc l'idée à la base de l'invention est, qu'en raison de la variabilité limitée des mutations possibles en chaque position d'une séquence d'acides aminés, même au sein d'un épitope hypervariable, la connaissance d'un nombre même restreint de variants de l'épitope considéré, permettait d'appréhender les positions de ceux des acides aminés sujets à variations et ceux d'entre eux peu sensibles à des mutations, d'une part, et les natures locales de ces mutations dès lors qu'un nombre seulement restreint

de variants auraient été identifiés, d'autre part. Conformément à l'invention et à partir des observations de Putney et al, il est proposé, dans le cas de l'épitope contenu dans la région centrale de HIV-1, de retenir au niveau de chaque position dans lesquelles des dégénérescences ont été observées, en tant qu'acides aminés les plus probables ceux dont l'existence a été constatée dans plus de 7 % des cas, sur la base des résultats publiés par Putney, y incluses les séquences comprenant les insertions Gln-Arg caractéristiques des séquences issues de LAV-III-B.

Selon l'invention il est proposé, notamment dans le cas de la production d'une composition vaccinnante qui mettrait en jeu la partie centrale hypervariable de la région V3 de la gp120, de produire une composition essentiellement constituée d'un mélange (faisceau), de peptides parmi lesquels des peptides susceptibles d'induire la formation chez l'homme ou l'animal d'anticorps reconnaissant des épitopes spécifiques de variants de retrovirus HIV, caractérisée en ce qu'elle contient la quasi totalité des séquences découlant de toutes les combinaisons possibles qui peuvent être réalisées entre les acides aminés successifs respectivement sélectionnés un à un dans les colonnes successives 1 à 26 de la formule globale ci-dessous indiquée :

FIGURE 4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26



les tirets de certaines positions (notamment aux positions 10, 12 et 23 dans l'exemple considéré) correspondant à des liaisons directes entre les acides aminés adjacents en des positions voisines.

On aura compris au vu de la formule globale ci-dessus, considérée à titre d'exemple :

- que les acides aminés représentés aux positions 1, 2, 3, 12, 13, 14, 15, 24, 25 et 26 sont caractérisés par une grande stabilité dans toutes les séquences épitopiques considérées,
- que les acides aminés présents aux positions 4 et 5, sont le plus souvent consitutés par K et R,
- que l'acide aminé en position 8, donnait lieu à plus grande dispersion (6 acides aminés possibles).

On remarquera que l'on a retenu dans le "faisceau" considéré de peptides, et cela en chacune des positions successives des séquences des peptides étudiés qui, après mise en alignement (notamment à l'aplomb les uns des autres) des acides aminés les plus stables au sein des divers épitopes étudiés, correspondent à ceux des acides aminés qui dans ces

mêmes positions sont apparus dans plus de 7 % des séquences épitopiques séquencées.

L'invention fournit dans l'exemple considéré une composition contenant un nombre considérable de peptides, de l'ordre de $7,5.10^5$ peptides possédant néanmoins une parenté de structure, souvent même immunologique, avec les séquences individuelles correspondantes aux épitopes respectivement issus de la totalité des 138 isolats dont il a été question plus haut.

On peut remarquer que parmi les $7,5.10^5$ peptides probables inclus dans la formule générale sus-indiquée, 53 % d'entre eux ont une homologie d'au moins 68 % avec chacune des séquences individuelles à partir desquelles cette formule globale a été dégagée (en appliquant la règle des au moins 7 % des acides aminés observés dans chacune des positions successives des séquences issues des 138 variants examinés).

L'invention concerne également plus généralement toute composition de peptides répondant au même principe, c'est-à-dire toute compositions contenant des peptides tous issus de régions hypervariables d'une protéine commune à des agents pathogènes de type déterminé ayant en commun une ou plusieurs propriétés immunologiques et comportant en commun certains acides aminés, dont les représentations écrites dans le même ordre peuvent être mise en correspondance ou en alignement en des positions rendues communes au sein de la leurs séquences respectives en acides aminés, le cas échéant au prix, d'une part, d'un ou plusieurs décalages des acides aminés voisins non communs,

déterminés au préalable et en nombre fini à des positions distinctes échelonnées entre les positions des acides aminés communs et, d'autre part, de la formation d'espacements ou "vides" qui, le cas échéant, en résulte au sein des séquences en acides aminés des peptides plus courts correspondant aux épitopes eux-mêmes les plus courts, cette composition étant caractérisée en ce qu'elle contient la quasi totalité des peptides dont les séquences en acides aminés découlent de toutes les possibilités d'enchaînement qui peuvent être conçues en puisant successivement un acide aminé dans chacun des groupes d'acides aminés alors localisés dans les positions alignées ou communes successives résultant de la susdite mise en correspondance ou en alignement.

L'invention concerne également un procédé pour la fabrication de telles compositions ou "faisceaux" de peptides. Il peut être défini comme un procédé de préparations simultanées d'un faisceau de plusieurs peptides déterminés qui présentent entre eux une ou plusieurs parentés immunologiques et qui comportent au moins certains acides aminés en commun dont les représentations écrites peuvent, dans le même ordre, être mises en correspondance au sein de leurs séquences respectives en acides aminés, le cas échéant au prix d'un ou plusieurs décalages des acides aminés voisins à des positions distinctes avec pour conséquence la production d'espacements ou "vides" en certaines des positions des séquences en acides aminés des peptides plus courts, ce procédé comprenant les étapes suivantes:

1) fixations simultanées de l'ensemble des acides aminés du deuxième groupe, destinés à occuper les deuxièmes positions au sein des peptides du faisceau final, sur un ensemble d'acides aminés du premier groupe devant occuper les "premières positions"

2) fixations simultanées de l'ensemble des acides aminés du troisième groupe sur les acides aminés occupant les "deuxièmes positions" des peptides précédemment produits, pour produire un ensemble de peptides comprenant les aminoacides devant occuper les troisièmes positions dans les peptides du faisceau final,

3) réitérations successives des fixations des acides aminés des groupes suivants pour successivement allonger les chaînes des peptides précédemment formées par les acides aminés devant occuper les positions successives suivantes correspondantes respectives dans les peptides du faisceau final,

étant entendu qu'en corrélation avec chaque position à laquelle doivent correspondre des "vides" dans les séquences de certains des peptides du faisceau final, on règle chaque fois les conditions de la fixation des acides aminés du groupe correspondant, de façon à n'autoriser l'allongement que d'une partie seulement des peptides déjà formés, le mélange de chaînes alors obtenues constituant alors le produit de départ pour la fixation des acides aminés du groupe suivant au cours de l'étape suivante.

Il apparaîtra clairement, notamment lorsque le procédé est appliqué à la production du faisceau de peptides dérivés de HIV-1 et dont il a été question

plus haut, que les groupes successifs donc question dans la définition du procédé qui précède comprennent respectivement les acides aminés suivants :

- position 1 : N
- position 2 : N
- position 3 : T
- position 4 : R, K
-
- position 8 : H, R, Y, T, P, S, etc...

Pour celles des positions auxquelles correspondent des groupes formés d'un acide aminé unique, le procédé de synthèse relèvera de la synthèse peptidique classique. il en sera encore de même pour l'allongement des chaînes déjà produites, lorsque l'on aborde un groupe contenant plusieurs acides aminés, si ce n'est que l'acide aminé supplémentaire ajouté en synthèse classique est remplacé par plusieurs acides aminés à la fois, par exemple : R, K à la quatrième position, ... H,R,Y,T,P et S à la huitième position

Par "faisceau de plusieurs peptides déterminés qui présentent entre eux une ou plusieurs parentés immunologiques" on comprendra que les différents peptides du faisceau, tout en possédant un certain nombre d'acides aminés susceptibles d'être mis en alignement dans des positions déterminées, pourraient néanmoins avoir des propriétés immunologiques sensiblement différentes. Il peut être intéressant d'envisager de produire, de façon simultanée, un faisceau de peptides caractérisé par les possessions cumulées de propriétés immunologiques globalement distinctes. Le plus

souvent cependant, le problème sera posé vis-à-vis de séquences peptidiques issues de variants relativement éloignés provenant d'une classe d'agents pathogènes connus pour leur aptitude à induire des affections pouvant néanmoins se manifester par des signes cliniques semblables, par exemple HIV-1 et HIV-2.

En ce qui concerne le "réglage" des conditions de la fixations des acides aminés en une position correspondant à un "vide" dans certaines des séquences qui sont finalement obtenues, il peut être obtenu :

- soit en faisant réagir les séquences des acides aminés déjà obtenues avec une proportion stoechiométriquement insuffisante d'acides aminés du groupe supplémentaire, (par exemple avec une proportion stoechiométrique insuffisante du seul acide aminé Q en dixième position dans l'exemple précédent),

- soit, en isolant une partie des chaînes peptidiques des chaînes déjà formées (par exemple, les decapeptides dans l'exemple considéré), pour ne faire réagir que l'autre partie avec les acides aminés du onzième groupe pour former les un-décapeptides correspondants.

Les produits résultant de la réunion des décapeptides et les un-décapeptides sus-indiqués constituent alors l'ensemble des peptides devant ensuite être traités dans les conditions sus-indiquées avec les acides aminés correspondant au douzième groupe, etc...

Dans un mode de mise en avant préféré du procédé selon l'invention, on met en oeuvre un

procédé de synthèse peptidique faisant application des principes décrits par R.B. Merrifield (J. Am. Chem. Soc., (1963) 85, 2149), de sorte que l'acide aminé (ou les acides aminés) du premier groupe (N, dans l'exemple considéré), auront été fixés au préalable sur un support solide (résine).

On conçoit que dans une telle variante du procédé le réglage des conditions permettant l'allongement seulement d'une partie des premiers peptides formés sera particulièrement aisé à réaliser, et ce notamment en retirant du milieu de réaction la proportion prédéterminée par l'expérimentateur de résine portant les peptides intermédiaires formés, et, s'il y a lieu, à l'occasion de la fixation des acides aminés du groupe suivant, de remélanger (une partie ou la totalité) de la résine retirée avec les produits obtenus au terme de la fixation des acides aminés du groupe précédent sur les produits précédemment maintenus dans le milieu de réaction.

Dans les cas (pour la synthèse d'autres faisceaux de peptides) où un "vide" serait à prévoir dès la position numéro 1, on conçoit aisément, surtout dans l'hypothèse où aucun "vide" ne serait à prévoir en position 2, que la fixation des acides aminés du deuxième groupe sera alors effectuée sur un mélange de résine portant déjà les acides aminés du premier groupe et d'un supplément de résine vierge, étant entendu que dans l'hypothèse évoquée le produit de fixation résultant des fixations simultannées de l'ensemble des acides aminés du deuxième groupe consisterait alors en un mélange de molécules de support portant les unes, un

ou plusieurs dipeptides, et les autres un seul aminoacide.

Dans les variantes de procédés qui ont été exposés plus plus, il a été question de la production du faisceau de peptides, en ayant recourt à des fixations successives d'acides aminés sur des peptides partiels préformés, ces fixations intervenant au cours d'étapes successives, aminoacide par aminoacide. Il va naturellement de soi, que les définitions indiquées couvriraient également les étapes de procédés strictement équivalentes qui représenteraient les enchaînements sur un premier produit de fixation consistant en un faisceau de peptides partiels préformés de dipeptides ou de tripeptides également préformés, en une seule étape. Dans l'exemple considéré, on pouvait concevoir que les peptides préformés partiels comprenant déjà les acides aminés aux positions 1-11, soient allongés en une étape unique par un tétrapeptide correspondant aux acides aminés aux positions respectives 12, 13, 14 et 15 (GPGR). Les revendications qui suivent sont naturellement destinées à couvrir ce type de situations.

Les proportions relatives d'acides aminés dans chacun des groupes peuvent être réglées aux valeurs désirées. Concernant les peptides issus de la région V3 du virus HIV-1, il a été vu, pour ce qui est des compositions multi-épitopiques de peptides correspondantes à ceux de la région V3 du virus HIV-1, que les inventeurs avaient retenu parmi les acides aminés pris en considération au niveau de chacune des positions (ou pour la consitution de chacun des groupes correspondants) de ceux des

acides aminés dont la présence avait été observée dans au moins 7 % des séquences correspondantes naturelles. Ces valeurs de pourcentage ne présentent aucun caractère critique, surtout lorsqu'ils sont appliqués à la détermination relative de chacun des acides aminés devant occuper les positions correspondantes dans les faisceaux finalement synthétisés. Il peut néanmoins être dit que d'une façon générale les faisceaux de peptides préférés conformes à l'invention seront généralement caractérisés par la présence de chacun des acides aminés dans chacune des positions successives telles qu'elles ont été définies plus haut, en des proportions au moins égales à 5 % de la totalité des acides aminés d'un même groupe. Comme cela résulte déjà de l'exemple mentionné plus haut, le procédé selon l'invention donne par conséquent accès à des compositions ou des faisceaux de peptides susceptibles de "couvrir" la quasi totalité des mutations possibles au sein même des séquences hypervariables des séquences peptidiques ou des protéines issues de l'agent pathogène contre lequel une vaccination est recherchée. On conçoit aisément que la nouveauté de l'invention se situe également au niveau du nombre de variants contenus dans une même composition "multi-épitopique" produite par le procédé selon l'invention. Ce nombre dépendra naturellement des longueurs des séquences souhaitées et des occurrences possibles de mutations au niveau des positions correspondantes des dites séquences aminées. Des compositions préférées de l'invention contiendront au moins 100, voire même au moins 1 000 séquences différentes, tout acide aminé en l'une

quelconque des positions du faisceau correspondant y étant alors présent à raison d'au moins 5 % de la totalité des acides aminés du groupe concerné.

La valeur sus-indiquée de "au moins 100, voire même au moins 1 000 acides aminés" illustre l'extraordinaire différence qui peut être faite entre les compositions selon l'invention et les mélanges dont l'utilisation avait auparavant été indiquée (par exemple mélange de 22 séquences proposé par Neurath). Ce nombre 1 000 est également très inférieur au nombre de peptides qui peuvent être produits de façon simultanée par l'application du procédé selon l'invention à la production d'un faisceau de peptides dérivés des parties centrales de la région centrale du HIV-1.

L'invention a également pour objet un "faisceau d'anticorps" reconnaissant l'ensemble des peptides du "faisceau de peptides" tel que défini ci-dessus.

L'invention concerne aussi l'utilisation des faisceaux de peptides ou d'anticorps tels que décrit ci-dessous pour la réalisation de kit de diagnostic.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement une méthode de diagnostic in vitro d'une pathologie liée à l'infection d'un individu par une ou différentes souches d'un même agent infectieux, qui comprend la mise en contact d'un tissu ou fluide biologique prélevé chez cet individu, avec une composition de peptides telle que décrite ci-dessus, dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre les peptides de ladite composition et les anticorps éventuellement présents dans le tissu ou fluide

biologique, et la détection in vitro des complexes peptides-anticorps éventuellement formés.

Un kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic telle que décrite ci-dessus comprend :

- une composition de peptides selon l'invention décrite ci-dessus, le cas échéant marqués, notamment à l'aide d'un marqueur radioactif ou enzymatique,

- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,

- les réactifs permettant la détection des complexes peptides-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs étant le cas échéant marqués, ou susceptibles d'être reconnus par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où les peptides sus-mentionnés ne sont pas marqués.

L'invention a également pour objet une méthode de diagnostic in vitro d'une pathologie liée à l'infection d'un individu par une ou différentes souches d'un même agent infectieux, qui comprend la mise en contact d'un tissu ou fluide biologique prélevé chez cet individu, avec des anticorps selon l'invention cités ci-dessus, dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre lesdits anticorps et les antigènes éventuellement présents dans le tissu ou fluide biologique, et la détection in vitro des complexes anticorps-antigènes éventuellement formés.

Un kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic, telle que décrite ci-dessus comprend :

- des anticorps tels que décrits ci-dessus, le cas échéant marqués, notamment à l'aide d'un marqueur radioactif ou enzymatique,

- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,

- les réactifs permettant la détection des complexes anticorps-antigènes produits par la réaction immunologique, ces réactifs étant le cas échéant marqués, ou susceptibles d'être reconnus par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où les peptides sus-mentionnés ne sont pas marqués.

La description à titre non limitatif de l'exemple qui suit illustre les capacités d'enrichissement considérable des compositions vaccinales, non seulement en les peptides correspondant aux séquences qui ont pu (ou qui pourraient) être identifiées dans des protéines déjà isolées, mais aussi en toutes les autres séquences peptidiques incluant toutes les variations ou mutations localisées possibles, telles que choisies à l'origine par le préparateur. Il va de soi que la personne du métier ne serait être limitée dans le choix d'autres variantes, notamment au niveau des techniques de synthèse peptidique mise en oeuvre. Les techniques utilisées dans l'exemple pour assurer la protection des fonctions des acides aminés et séquences peptidiques qui ne doivent pas dans les réactions, tant comme les techniques de déprotection de ces fonctions au termes des étapes successives d'allongement de chaînes relèvent en elles-mêmes de techniques dûment éprouvées.

**EXEMPLE DE SYNTHÈSE D'UNE COMBINAISON DE PEPTIDES
CI-APRÈS DESIGNES PAR L'EXPRESSION MIXOTOPE :**

La troisième région variable V3 de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 d'HIV-1 de 11

isolats de virus différents (HXB2, BRU, SF2, MN, SC, JH3, BRVA, CDC4, NY5, WMJ2, RF), a été utilisée pour la construction du mixotope. Ces séquences ont été alignées de la manière indiquée ci-dessus, et la synthèse a été effectuée à partir du tripeptide commun NNT, en utilisant des vides (gaps) correspondant au dipeptide QR sur la gauche du motif critique GPG pour les séquences contenant le motif type IHIGPG. Une cystéine additionnelle a été introduite à la position C-terminale, afin de permettre le couplage à une protéine porteuse par l'intermédiaire d'un agent hétérobifonctionnel, l'ester de l'acide N-hydroxysuccinimide-maléimidocaproïque (Lee, A.C., Mol. Immunol. (1980), 17, 749-756). Les acides aminés introduits au niveau des positions dégénérées ont été sélectionnés selon les données statistiques de Putney et al (4ème colloque des cent gardes 1989, 189-193 (1990)), en ne prenant en considération de façon arbitraire que les acides aminés dont les pourcentages de présence au niveau de ces positions sont supérieurs à 7 %. Dans chacune de ces positions les différents acides aminés (ou les différents vides en acides aminés) sont représentés par un équivalent de fraction (par exemple : 1/3 pour chaque acide aminé dans les positions où trois possibilités ont été prises en compte, 1/6 lorsque 6 possibilités ont été prises en compte).

La synthèse du mixotope a été réalisée suivant la technique BOC-TFA (R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. (1963), 85, 2149), sur un synthétiseur de peptides automatique 430A (Applied Biosystem) selon un procédé permettant la synthèse simultanée de

séquences mixtes, ce procédé dérivant de la méthode utilisée pour la synthèse des oligonucléotides : des quantités équimoléculaires d'acides aminés protégés appropriés ont été utilisées dans les réactions de couplage. Les groupes protecteurs des chaînes latérales sont les suivants : Glu (OBzl), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Arg (Tos), Tyr (BrZ), Cys (4-MeBzl), Met (O), His (Bom). Afin de compenser les différentes cinétiques dans les réactivités des différents acides aminés, un premier couplage a été réalisé avec une quantité totale d'1 mmole de l'acide-BOC introduit (ou des acides-BOC mélangés) c'est-à-dire équivalent au composant amino. Un second couplage, utilisant une quantité totale de 2 mmoles, a ensuite été systématiquement réalisée. Le procédé d'activation utilisé correspond à celui de la méthode DCC-HOBT (dicyclohexyl carbodiimide-hydroxybenzotriazole) (König W. et Geiger R., Chem., Ber, (1970), 103, 788) dans laquelle l'espèce active en solution est probablement l'ester 1-hydroxybenzotriazole relativement stable conduisant à une longue période de couplage (90 minutes). Le solvant utilisé est le NMP (N-méthyl pyrrolidone) durant les 30 premières minutes. Du DMSO (diméthyl sulfoxyde) est ensuite introduit dans le réacteur pendant les 60 dernières minutes et un équivalent de DIEA (diisopropyl-éthyl-amine) est ajouté après 45 minutes afin de neutraliser les propriétés acides de l'HOBT formé durant la réaction. Afin d'éviter la formation d'acide pyroglutamique, un procédé différent a été utilisé lorsque l'on couple des résidus glutamine : dans ce cas, le couplage est réalisé dans un temps plus court (30 minutes) avec

addition de DMSO après 20 minutes, mais sans addition de DIEA suivi par un second couplage de 35 minutes avec 2 mmoles et avec addition de DMSO après 20 minutes et de DIEA après 30 minutes. Après chaque cycle, la totalité de la réaction de couplage a été testée par dosage quantitatif à la ninhydrine. Un troisième couplage est ensuite effectué selon une procédure classique si nécessaire. La programmation de l'appareil a été étudiée afin d'optimiser l'agitation durant l'introduction des solvants et des réactifs. Les vides (gaps) ont été obtenus en retirant la moitié de la résine de peptide durant l'incorporation de Ile en position 23, et durant l'incorporation du dipeptide Gln-Arg en position 10-11.

Après assemblage de la chaîne peptidique complète, le groupe t-BOC a été supprimé à l'aide de TFA à 50 %, et la résine a été séchée, clivée et déprotégée dans un appareil Téflon-Kel F-HF (Asti, Courbevoie, FRANCE)) à faible concentration en HF dans du diméthylsulfide (Tam J.P., et al, J. Am. Chem. Soc. 105, 642, (1983)) en présence de p-crésol et de p-thiocrésol (25:65:7,5:2,5) pendant 2h à 0°C suivi d'un procédé en forte concentration en HF, p-crésol et thiocrésol (90:7,5:2,5) pendant 1h à 0°C. Le peptide clivé déprotégé a été précipité et lavé abondamment avec du diéther froid, puis dissous dans de l'acide acétique à 5 % et lyophilisé. Le peptide brut a été dissous dans du TFA pur (30 ml) et a été précipité dans du diéther refroidi dans de la glace (300 ml). Après centrifugation, le précipité a été dissous dans l'eau et lyophilisé. La construction "mixotope"

a été hydrolysée avec HCl-6N/phénol (10.1) dans un analyseur en aminoacide Beckman modèle 7300 avec détection à la ninhydrine. La composition en aminoacides est en accord avec la valeur calculée à partir de la composition théorique, ce qui indique qu'aucun couplage préférentiel significatif ne s'est produit.

Le mixotope ainsi synthétisé (dont la formule globale a été indiquée plus haut) contient un mélange de $7,5.10^5$ environ peptides, parmi lesquels 53 % ont plus de 68 % d'analogie avec chacune des séquences individuelles à partir desquelles avait été choisis les acides aminés devant appartenir aux groupes successifs qui devaient être mis en oeuvre pour la réalisation de cette construction.

Des antisérums dirigés contre le mixotope (ou faisceau de peptides) seul ou conjugué à une protéine porteuse (telle que l'anatoxine tétanique) ont été obtenus chez des lapins.

La conjugaison du mixotope avec la protéine porteuse a été réalisée de la manière suivante : après réduction avec PBU_3 10 % ($0,5 \mu\text{moles/mg}$) (Rüegg V.T., et al Methods Enzymol, (1977), 47,111) pendant 30 minutes, le mixotope a été cojugué par l'intermédiaire de la cystéine C-terminale en utilisant l'ester de l'acide N-hydroxysuccinimide 6-maléimidocaproïque en tant qu'agent hétérobifonctionnel permettant la liaison. Les conjugués ont été concentrés par ultrafiltration, abondamment dialysés contre du PBS, et stérilisés par filtration sur des filtres de $0,22 \mu\text{m}$.

Le procédé d'hyperimmunisation des lapins a été réalisé de la manière suivante : des lapins

(femelles, de Nouvelle Zélande) ont tout d'abord été immunisés par injection sous-cutanée (sous l'omoplate) de peptide (mixotope) libre ou conjugué à l'anatoxine tétanique (selon la méthode décrite ci-dessus) (1 mg de peptide dans 1 ml de tampon phosphate) dans de l'adjuvant complet de Freund au jour 0. Des injection sous-cutanées de peptide libre (1 mg dans 1 ml de tampon phosphate) dans de l'adjuvant incomplet de Freund ont été réalisées aux jours 14, 28 et 49 et toutes les 3 semaines chez ces mêmes lapins.

Les sérums obtenus chez le lapin ont été testés sur des microplaques enduites de mixotope selon la méthode ELISA. Le test immunoenzymatique (ELISA) a été réalisé de la manière suivante : de plaques de 96 puits (Nunc) ont été incubées une nuit à température ambiante avec 200 μ l d'une solution à 10 μ l/ml de peptide-antigène dans un tampon carbonate/bicarbonate pH 9,6, puis bloquées avec 300 μ l d'une solution de caséine 1 % dans 1,8 % NaCl/0,01 M PBS, pH 7,2, durant une heure à température ambiante. Après lavage (1,8 % NaCl/0,01 M PBS, pH 7,2/0,1 % Tween-20), 200 μ l de dilutions au 1/2 de sérums dans une solution de 1 % de caséine/1,8 % NaCl/0,01 M PBS, pH 7,2 ont été additionnés dans des puits dupliqués et incubés 2 heures à 37°C ; la présence d'anticorps a été révélée après plusieurs lavages par addition de 200 μ l d'IgG (H+L) de chèvres anti-lapins couplés à la peroxydase de raifort (Diagnostic Pasteur). Après incubation (2h à 37°C) et lavages, une solution de substrat (tampon citrate/H₂O₂/OPD) est additionnée. Après 30 mn d'incubation sous protection de la

lumière à température ambiante, la réaction a été stoppée en utilisant 100 μ l d' H_2SO_4 4N. L'absorbance a été enregistrée à 492 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Dynatech).

La même opération a également été réalisée avec 3 peptides individuels : le peptide V3 BRU (TRPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAH), qui correspond à l'une des séquences utilisées pour la construction du mixotope (bien qu'il ne puisse pas excéder une partie sur 750 000 du mélange) et le peptide V3 MN : TRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAHCC, qui ne correspond pas parfaitement à aucune des séquences du mixotope (les résidus soulignés ne sont pas représentés dans le mélange). Des titres significatifs contre à la fois le mixotope et les peptides individuels ont été obtenus, ce qui suggère que le mixotope induit une réponse spécifique et largement croisée en anticorps dirigée contre les peptides individuels V3. Par contre, aucune réaction significative n'a été observée lorsque les deux peptides ne correspondant pas ont été testés.

Afin d'étudier si les anticorps générés à la suite de l'immunisation à l'aide de mixotope était capable de reconnaître la protéine d'enveloppe gp120, les antisérums ont été testés par l'immunotransfert (Western Immunoblot) à l'aide de polypeptides provenant de HIV-1 IIIB et séparés par électrophorèse ; il a ainsi été déterminé que les anticorps reconnaissaient exclusivement la gp120.

L'analyse par Western Blot a été réalisée de la manière suivante :

Un kit commercial pour la détection de l'activité sérique vis-à-vis de HIV (Du Point HTLV-

III Western Blot IgG) a été utilisé suivant le protocole d'utilisation décrit par le fabricant. Les anticorps de contrôle humains ont été détectés en utilisant des IgG de chèvres anti-humaines biotynilées (chaînes H et L) puis de l'avidine conjuguée à la peroxydase de raifort. Les anticorps de lapins ont été détectés en utilisant des IgG de chèvres anti-lapins (chaînes H et L) couplées à la peroxydase de raifort. Les révélations ont été effectuées avec le substrat de l'enzyme, 4-bromo-1-naphtol dans une solution de méthanol/PBS/H₂O₂.

Des études d'immunofluorescence réalisées en utilisant la lignée cellulaire humaine de monocytes U937, montrent que les anticorps antimixotopes reconnaissent les cellules U937 infectées avec un isolat de HIV-1 IIIB, mais pas les cellules U937 non infectées ; les anticorps de contrôle ne se sont liés ni aux cellules infectées ni aux cellules non infectées.

Les anticorps sus-mentionnés présentent un effet neutralisant l'infection par HIV de monocytes humains et de lignées cellulaires de cellules T.

La neutralisation de HIV a été étudiée de la manière suivante :

la souche HTLV IIIB de HIV-1 a été incubée pendant 2 heures à 37°C avec un milieu constitué de divers sérums de lapin dans un volume final de 600 µl de RPMI contenant 2 % de sérum foetal de veau. Les cellules ($4,5 \cdot 10^5$), constituées soit par la lignée cellulaire de monocytes U937, ont ensuite été additionnées pendant 2 heures à 37°C dans un volume final de 1 ml, la concentration finale en HIV-1 étant de 5 000 cpm/ml de 500 cpm/ml en

activité de transcriptase inverse, et la concentration finale en sérum de lapin étant de 1/50 et 1/1 000. Après 2 lavages, les cellules ont été ressuspendues dans un milieu frais et divisées en 3 (10^5 cellules par ml). Tous les 3 ou 4 jours la production virale a été évaluée par dosage de la protéine p24 du noyau, après addition de triton 0,5 %, selon la méthode ELISA.

Il a été montré que des anticorps obtenus à partir de lapins immunisés contre le mixotope conjugués à une molécule porteuse, sont capables de prévenir l'infection de la lignée cellulaire MOLT4CD4+ de cellules T par l'isolat HTLV-IIIB de HIV-1. Les anticorps ont un effet neutralisant jusqu'à une dilution de 1/1 000 alors que les anticorps de contrôle de lapin n'ont pas d'effet neutralisant à une dilution de 1/50. Puisque des différences concernant l'interaction entre la protéine gp120 d'HIV et le récepteur CD4 ont été remarquées dans les lignées cellulaires humaines et de monocytes, des anticorps ont également été testés sur la lignée de monocytes U937, et présentent le même effet neutralisant. De façon surprenante, les anticorps obtenus après immunisation avec le mixotope libre, bien que présentant le même titre contre le mixotope et contre les peptides individuels V3 que les anticorps obtenus après immunisation avec le mixotope conjugué avec la molécule porteuse, ne se lient pas aux cellules infectées par HIV et présentent aucun effet neutralisant significatif. Cela suggère que le couplage à une protéine porteuse entraîne des différences qualitatives dans la réponse en

anticorps. Puisque le couplage du mixotope avec la molécule support est réalisé par l'intermédiaire du groupe SH de la cystéine C-terminale, la conformation tridimensionnelle du mixotope ne devrait pas être modifiée de manière significative par rapport au mixotope libre. Par conséquent il est probable que les différences dans la nature de la réponse en anticorps résultent de différences dans les types de cellules T produites. Ces résultats indiquent qu'une stratégie de vaccination contre HIV utilisant le mixotope se ferait avantageusement à l'aide de mixotopes conjugués. Dans un tel cas, le mixotope couplé à une protéine d'HIV, telle que la protéine GAG ou POL, pourrait représenter un conjugué optimal.

La construction du mixotope a été réalisée en considérant qu'il n'existe aucune corrélation entre les mutations observées. Toutefois l'analyse des séquences de la boucle V3 provenant de plus de 200 isolats suggère l'existence de classes discrètes de virus (Bolognesi D.P., 4ème Colloque des Cent Gardes, 1989, 181-188, (1990)), qui présentent des caractéristiques communes au niveau de leur séquence en acides aminés, telle que la séquence IleHisIleGlyProGlyArgAlaPhe caractéristique des séquences du type MN ou la séquence GlnArgGlyProGly caractéristique des séquences du type LAV1 (BRU). Des constructions du type mixotope correspondant à chacune de ces sous-classes seraient particulièrement avantageuses dans le cadre de la vaccination contre HIV.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparations simultanées d'un faisceau de plusieurs peptides déterminés qui présentent entre eux une ou plusieurs parentés immunologiques et qui comportent au moins certains acides aminés en commun dont les représentations écrites peuvent, dans le même ordre, être mises en correspondance au sein de leurs séquences respectives en acides aminés, le cas échéant au prix d'un ou plusieurs décalages des acides aminés voisins à des positions distinctes avec pour conséquence la production d'espacements ou "vides" en certaines des positions des séquences en acides aminés des peptides plus courts, ce procédé comprenant les étapes suivantes:

1) fixations simultanées de l'ensemble des acides aminés du deuxième groupe, destinés à occuper les deuxième positions au sein des peptides du faisceau final, sur un ensemble d'acides aminés du premier groupe devant occuper les "premières positions",

2) fixations simultanées de l'ensemble des acides aminés du troisième groupe sur les acides aminés occupant les "deuxièmes positions" des peptides précédemment produits, pour produire un ensemble de peptides comprenant les aminoacides devant occuper les troisièmes positions dans les peptides du faisceau final,

3) réitérations successives des fixations des acides aminés des groupes suivants pour successivement allonger les chaînes des peptides précédemment formées par les acides aminés devant

occuper les positions successives suivantes correspondantes respectives dans les peptides du faisceau final, étant entendu qu'en corrélation avec chaque position à laquelle doivent correspondre des "vides" dans les séquences de certains des peptides du faisceau final, on règle chaque fois les conditions de la fixation des acides aminés du groupe correspondant, de façon à n'autoriser l'allongement que d'une partie seulement des peptides déjà formés, le mélange de chaînes alors obtenues constituant alors le produit de départ pour la fixation des acides aminés du groupe suivant au cours de l'étape suivante.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le réglage des conditions de la fixation des acides aminés en une position correspondante à un "vide" dans certaines des séquences qui doivent être finalement obtenues, est réalisé, soit en faisant réagir les séquences des acides aminés déjà obtenues avec une proportion stoechiométriquement insuffisante d'acides aminés du groupe supplémentaire, soit en isolant une partie des chaînes peptidiques déjà formées pour ne faire réagir que l'autre partie avec les acides aminés d'un groupe supplémentaire pour former le faisceau de peptides partiels alors allongés d'un acide aminé supplémentaire,

les produits résultant de la réunion des peptides partiels provisoirement laissés de côté et des peptides partiels allongés d'un acide aminé supplémentaire constituant alors le groupe de peptides partiels devant être mis en réaction dans

les conditions sus-indiquées avec les acides aminés du groupe suivant.

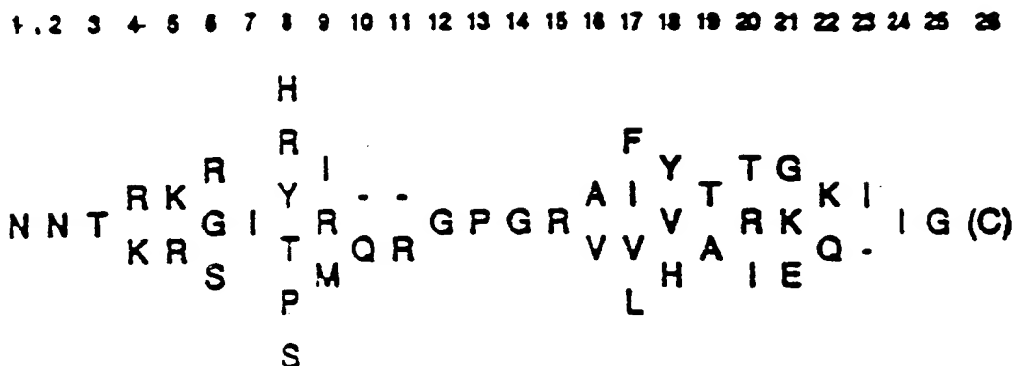
3. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que l'acide aminé (ou les acides aminés) du premier groupe ont au préalable été fixés sur une résine ou support approprié pour la réalisation des synthèses peptidiques mettant en oeuvre la technique de Merrifield.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la partie du faisceau de peptides partiels devant être soustraite à la réaction avec les acides aminés du groupe suivant sont séparés du milieu de réaction, l'étape suivante étant alors réalisée sur l'autre partie des peptides partiels retenus sur le support avec les acides aminés du groupe suivant, les peptides partiels portés par la résine initialement soustraits du milieu de réaction étant, le cas échéant, réunis au produit de réaction obtenu au terme de l'étape précédente, le mélange obtenu étant alors à son tour, en partie ou en totalité, mis en réaction avec les acides aminés appartenant au groupe suivant.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on réalise simultanément la production d'un faisceau de peptides dérivés dans les conditions sus-définies de séquences épitopiques dérivées de la partie centrale de la région V3 de HIV.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les acides aminés appartenant aux groupes successifs correspondent à ceux qui figurent aux positions 1-26 de la formule suivante

globalement représentative du faisceau du peptide à obtenir.



7. Composition de peptides comprenant un mélange (faisceau) de peptides parmi lesquels un nombre déterminé de peptides contenant des épitopes issus d'une région hypervariable d'une protéine d'un type d'agent pathogène déterminé, ces épitopes comportant néanmoins certains acides aminés en commun dont les représentations écrites dans le même ordre peuvent être mises en correspondance ou en alignement en des positions rendues communes au sein de la leurs séquences respectives en acides aminés, le cas échéant au prix, d'une part, d'un ou plusieurs décalages des acides aminés voisins non communs, déterminés au préalable et en nombre fini à des positions distinctes échelonnées entre les positions des acides aminés communs et, d'autre part, de la formation d'espacements ou "vides" qui, le cas échéant, en résulte au sein des séquences en acides aminés des peptides plus courts correspondant aux épitopes eux-mêmes les plus courts, cette composition étant caractérisée en ce qu'elle

contient la quasi totalité des peptides dont les séquences en acides aminés découlent de toutes les possibilités d'enchaînement qui peuvent être conçues en puisant successivement un acide aminé dans chacun des groupes d'acides aminés alors localisés dans les positions successives résultant de la susdite mise en correspondance ou en alignement.

8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 100, voire même au moins 1 000 peptides individuels.

9. Composition selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisée en ce que la composition de peptides contient des séquences hypervariables dérivées de variants de HIV.

10. Composition selon la revendication 9, qui peut être représentée par la formule globale ci-dessous :

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

H
R I - - F Y T G K I
N N T R K G I Y R Q R A I V T R K I G (C)
K R S P M Q R V V H A I E Q .
S

11. Principe actif de vaccin, caractérisé en ce qu'il contient une composition de peptides tels que définis dans l'une quelconque des revendications 7 à 10.

12. "Faisceau d'anticorps" reconnaissant l'ensemble de peptides du "faisceau de peptides" tel que défini dans l'une quelconque des revendications 7 à 10.

13. Utilisation des faisceaux de peptides selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, ou du faisceau d'anticorps selon la revendication 12 à la réalisation de kit de diagnostic.

14. Méthode de diagnostic in vitro d'une pathologie liée à l'infection d'un individu par une ou différentes souches d'un même agent infectieux, qui comprend la mise en contact d'un tissu ou fluide biologique prélevé chez cet individu, avec une composition de peptides selon l'une des revendications 7 à 10, dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre les peptides de ladite composition et les anticorps éventuellement présents dans le tissu ou fluide biologique, et la détection in vitro des complexes peptides-anticorps éventuellement formés.

15. Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic selon la revendication 14, comprenant :

- une composition de peptides selon l'une des revendications 7 à 10, le cas échéant marqués, notamment à l'aide d'un marqueur radioactif ou enzymatique,
- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,
- les réactifs permettant la détection des complexes peptides-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs étant le cas échéant marqués, ou susceptibles d'être reconnus par

un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où les peptides sus-mentionnés ne sont pas marqués.

16. Méthode de diagnostic in vitro d'une pathologie liée à l'infection d'un individu par une ou différentes souches d'un même agent infectieux, qui comprend la mise en contact d'un tissu ou fluide biologique prélevé chez cet individu, avec des anticorps selon la revendication 12, dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre lesdits anticorps et les antigènes éventuellement présents dans le tissu ou fluide biologique, et la détection in vitro des complexes anticorps-antigènes éventuellement formés.

17. Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic selon la revendication 16, comprenant :

- des anticorps selon la revendication 12, le cas échéant marqués, notamment à l'aide d'un marqueur radioactif ou enzymatique,
- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,
- les réactifs permettant la détection des complexes anticorps-antigènes produits par la réaction immunologique, ces réactifs étant le cas échéant marqués, ou susceptibles d'être reconnus par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où les peptides sus-mentionnés ne sont pas marqués.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9106957
FA 460709
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-9 003 984 (REPLIGEN) 10 Avr11 1990 * revendications 11,20,28,57-59 *	7-12

A	WO-A-9 102 544 (INSTITUT PASTEUR ET AL.) 7 Juillet 1991 *en entier*	7-17

X	EP-A-0 311 219 (STICHTING CENTRAAL DIERGENEESKUNDIG INSTITUUT) 12 Avr11 1989 * page 3, colonne de droite, ligne 35 - ligne 42 * * page 4, colonne de droite, ligne 32 - ligne 43 *	7-17

X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 86, no. 17, 1 Septembre 1989, WASHINGTON US pages 6768 - 6772; K JAVAHERIAN ET AL.: 'principal neutralizing epitope of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein' * page 6772, colonne de gauche, ligne 33 - ligne 52 *	7-17

A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 25, 23 Décembre 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 277485Z, SD PUTNEY ET AL.: 'hiv-1 principal neutralization determinant elicits broadly neutralizing antibodies' page 775 ;colonne D ; *abrégé*	7-17

	-/--	
Date d'achèvement de la recherche 23 JANVIER 1992		Examineur masturzo
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)

1

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9106957
FA 460709
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 23, 3 Décembre 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 209462Y, AR NEURATH ET AL.: 'confronting the hypervariability of an immunodominant epitope eliciting virus neutralizing antibodies from the envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1)' page 539 ; colonne D ; * abrégé *	7-12
X	INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPTIDE AND PROTEIN RESEARCH vol. 37, no. 6, 1 Juin 1991, COPENHAGEN, DK pages 487 - 493; A FURKA ET AL.: 'general method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures' *en entier*	1-6
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 23 JANVIER 1992		Examinateur masturzo
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1
EPO FORM 1503 03.82 (P0412)